

課題番号	Q18P-01
課題名（和文）	カスパーゼ 14 発現増強を介した皮膚保湿改善機構の開発
課題名（英文）	Investigation for novel skin moisturizer, activating Caspase 14 expression
研究代表者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 東京電機大学理工学部、生命理工学系、教授 氏名 長原 礼宗
共同研究者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名

研究成果の概要（和文）

細胞死の一種、アポトーシス時に活性化するタンパク質分解酵素、カスパーゼの中でもカスパーゼ 14 は哺乳類の角化細胞に豊富に存在し、アポトーシスとは無関係にタンパク質であるフィラグリンを分解して NMF を生成することが明らかになった。つまり、カスパーゼ 14 を効果的に発現誘導、活性化させる化合物は、皮膚保湿機能の改善につながる。我々は、カスパーゼ 14 の発現上昇を引き起こすフィトスフィンゴシンが、実際に動物やヒトにおいて、皮膚塗布によって保湿効果が生じるかどうか、非侵襲的な手法で検討した結果、フィトスフィンゴシン塗布により経皮水分蒸散量が減少しており、保湿能が向上したことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）

Caspase-14 was reported to be responsible for degrading profilaggrin, resulting in a substantial increase of the amount of NMFs. Caspase-14 is expressed predominantly in cornifying epithelia, and unlike other caspases, caspase-14 is not involved in apoptosis. That is, compound activating or inducing high amounts of Caspase-14 may lead to improving moisturizing function. We revealed that phytosphingosine upregulated caspase-14 expression. In the present study, we made phytosphingosine-containing cream and topically treated to mice and human skin and revealed the skin moisturization effect of phytosphingosine by non-invasive transepidermal water loss measurement.

1. 研究開始当初の背景

細胞死の一種である、アポトーシス時に活性化するタンパク質分解酵素として、カスパーゼが存在する。カスパーゼは、これまでに 14 種類存在することが明らかになっている。しかし、最近になって、その中でもカスパーゼ 14 は皮膚に豊富に存在すること、またアポトーシスとは無関係に、フィラグリンを分解して天然保湿因子 (NMF)をつくり、角質層のバリア機能、水分保持機能の維持に関与することが明らかになってきた。つまり、カスパーゼ 14 を効果的に発現誘導、活性化させる化合物は、皮膚機能の改善につながる。しかしながら、これまでに数少ない化合物しかカスパーゼ 14 発現促進能を有することが報告されていなかった。

これまでに、我々は皮膚や白血球など、細胞の交替が激しい細胞に多く存在するスフィンゴイド塩基類、特にフィトスフィンゴシンが、カスパーゼ 14 の合成促進効果を有することを見出してきた。また、マウスの皮膚にフィトスフィンゴシンを塗布したところ、0.1 μM という低濃度で顕著なカスパーゼ 14 量を発現上昇させることを明らかにした。また、フィトスフィンゴシンは 3 μM までの濃度では、マウス皮膚組織に炎症を引き起こさないことを確認していることもあり、安全性が高い化合物であるといえる。よって、スフィンゴイド塩基は、化粧品材料としての応用利用が考えられ、現在スフィンゴイド塩基の中でも最もカスパーゼ 14 発現上昇効果の高い、フィトスフィンゴシンの化粧品用途への応用を検討している。

今回は、フィトスフィンゴシンをマウスやヒトの皮膚に塗布した結果、実際に皮膚保湿を向上させるかどうかについて検証した。

2. 研究の目的

以上の背景下、本研究ではフィトスフィンゴシンをマウスやヒトに塗布し、実際に皮膚保湿向上が起きるかどうか、角質層のバリア機能喪失の指標となる、経皮水分蒸散量 (TEWL)を非侵襲的手法で測定することにより検証した。

3. 研究の方法

(1) マウスへのフィトスフィンゴシン塗布

ICR マウス(6~12 週齢 ♂、東京実験動物)の背中を麻

酔下バリカンで剃毛して実験に供した。毎日 0.5 g のクリーム (終濃度 3 μM のフィトスフィンゴシンを親水ワセリン基剤に混ぜたもの) を塗布した。対照実験としてフィトスフィンゴシンを溶解する時に使用した溶剤 (メタノール) を親水ワセリン基剤に混ぜたクリームを背部に塗布したマウスも用意した。

全ての動物実験は東京電機大学動物実験管理運用委員会において審査の上、行われた。

(2) ヒトへのフィトスフィンゴシン塗布

ヒトボランティアに対して毎日 0.5 g のクリーム (フィトスフィンゴシンを親水ワセリン基剤に混ぜたもの) を前腕内側に塗布した。

全ての実験は東京電機大学ヒト生命倫理審査委員会において審査の上、行われた。

(3) 皮膚水分蒸散量の測定

マウス、およびヒトの皮膚に TEWL を検出するプローブ、Tewameter TM300 (インテグラル) を用いて、TEWL の測定を行った。

(4) 皮膚の状態に関するアンケート実施

ヒトボランティアに対してアンケート形式での設問を実施し、安全性について検討した。塗布後にかゆみを生じたかどうか、肌荒れを生じたかどうか、発疹や赤みを生じたかどうか、その他皮膚の異常があったかどうかを聞いた。

4. 研究成果

(1) マウス皮膚におけるフィトスフィンゴシン塗布による TEWL の減少

5 日間、2 週間フィトスフィンゴシンを塗布したマウス皮膚の TEWL を、それぞれのコントロールクリームを塗布したマウス皮膚の TEWL と比較した結果、フィトスフィンゴシンを塗布したマウス皮膚の TEWL は、コントロールのマウス皮膚の TEWL に比べ減少している傾向が見られた。コントロールおよびフィトスフィンゴシンを塗布したマウスの TEWL ($\text{g}/\text{h}\text{m}^2$) の 5 日間の推移を図 1、2 週間の推移を図 2 に示した。

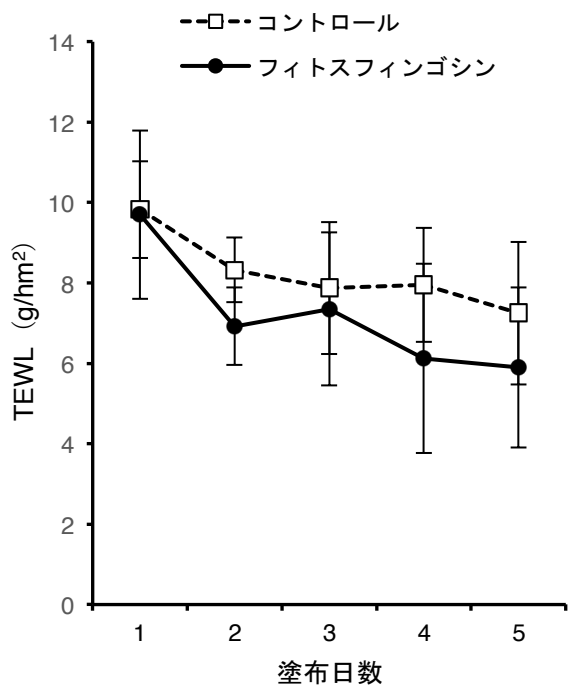


図 1. ICR マウスにおける TEWL (5 日間の推移)

図 3 に示す通り、フィトスフィンゴシンを 3 日間作用させることによって、塗布した箇所の TEWL は減少している傾向が見られた。また、塗布した皮膚の状態を観察した結果、肌に異常は見られず、アンケート回答結果でも、肌の異常を訴える人もいなかった。

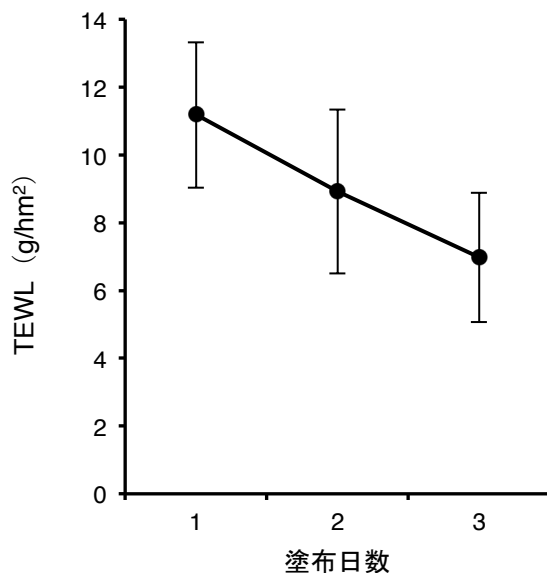


図 3. ヒトでの TEWL (3 日間の推移)

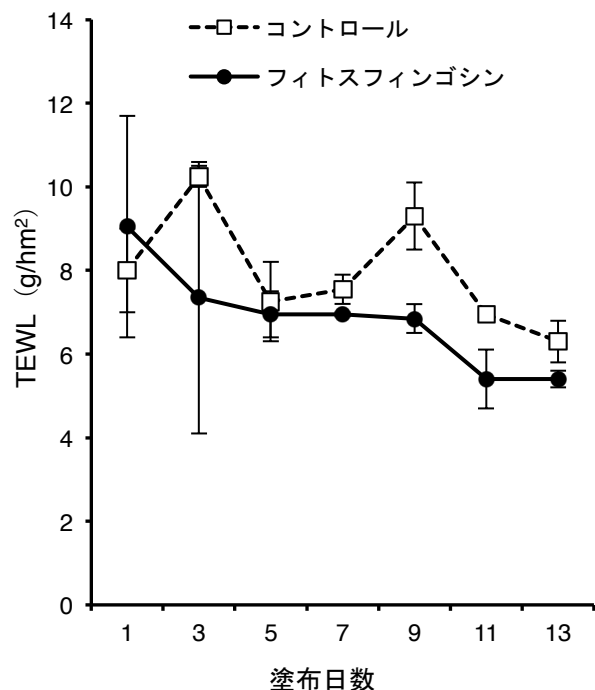


図 2. ICR マウスにおける TEWL (2 週間の推移)

(2) ヒト皮膚におけるフィトスフィンゴシン塗布による TEWL の減少

ヒトボランティアの前腕内側に 3 日間フィトスフィンゴシンを塗布し、TEWL を測定した。

(3) まとめ・今後の展望

TEWL は、皮膚保湿機能と大きく関係している。カスパーゼ 14 は NMF の増加を促進させ、結果として体内の水分を外部に逃がさないようにし、含水率を上昇させるとともに細胞体積が増加し、細胞間の結合を密にすることでバリア機能を保持させて TEWL を減少させる。本研究では実際にマウスおよびヒト皮膚にフィトスフィンゴシンを塗布し、TEWL を測定することにより、フィトスフィンゴシンの保湿への影響を検討した。結果より、マウス皮膚やヒト皮膚においてフィトスフィンゴシンを塗布した箇所の TEWL は減少した。このことから、フィトスフィンゴシンは肌の保湿力を向上させたと推察できる。ヒトでの結果の方がより TEWL 減少度が大きかったことについては、マウスの場合は動き回ることによってフィトスフィンゴシンを塗布したクリームが剥離して効果が減弱するのに対し、ヒトではそのようなことは起きづらく、効果が持続したためではないかと推察される。以上のことから、フィトスフィンゴシンは皮膚に塗布することで、カスパーゼ 14 を増加させることにより

皮膚の保湿力を向上させるものと考えられた。

また、本研究に参加したボランティア全員が塗布した箇所に何も炎症が起きなかったことから、フィトスフィンゴシンのヒト皮膚への安全性は高いと考えられた。

今後は、フィトスフィンゴシン塗布により含水率を上昇したのか、より NMF の増加と密接に関与する現象について検討し、フィトスフィンゴシンによる皮膚保湿への効果を探ることが望ましいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Y. Nagahara, K. Kawakami, A. Sikandan, D. Yagi, R. Nishikawa, and T. Shinomiya. Sphingoid base-upregulated caspase-14 expression involves MAPK. *Biol. Pharm. Bull.*, *41* (5), 2018, 査読有.